

СПИРКИНА Елена Сергеевна

**ПЕРОКСИДАЦИЯ ЛИПИДОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ
БЕЛКОВ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ КОЛЕННЫХ СУСТАВОВ В
НОРМЕ И ПРИ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЯХ**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Матвеева Елена Леонидовна

Официальные оппоненты:

Камилов Феликс Хусаинович – доктор медицинских наук, профессор, член- корр. АН РБ, член-корр. РАЕН, Заслуженный деятель науки РФ и РБ, ГБОУ ВПО "Башкирский государственный медицинский университет" Минздрава России, заведующий кафедрой биологической химии (г. Уфа).

Кадочникова Галина Дементьевна – доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВПО «Тюменский государственный нефтегазовый университет, Технологический институт, кафедра товароведения и технологии продуктов питания», профессор кафедры.

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «24» марта 2016 г. в 13.30 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВО «Институт фундаментальной медицины и биологии» по адресу: 420012 г. Казань, ул. Карла Маркса, д.74, ауд.205А. Телефон: 7(843) 236-76-40.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Электронная версия диссертации и автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» www.kpfu.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2015 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.б.н., профессор



(Абрамова З.И.)

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Деформирующий артроз (ДОА) крупных суставов отличается наиболее тяжёлым течением и в короткие сроки приводит к стойкой инвалидности и значительному снижению качества жизни (Anderson D.D. et al., 2011). Усиление процессов перекисидации имеет существенное значение в этиологии и патогенезе многих заболеваний и проявлении последствий различных экстремальных воздействий. При развитии патологического процесса баланс образования и потребления перекисей и других продуктов перекисидации может нарушаться, метаболиты накапливаются в тканях и биологических жидкостях, что приводит к их серьезным морфофункциональным изменениям. В связи с важной ролью перекисного окисления в патогенезе различных заболеваний определение продуктов этого процесса в биологическом материале, а именно, в сыворотке крови и синовиальной жидкости (СЖ), имеет все возрастающее диагностическое и прогностическое значение. В области травматологии и ортопедии выявлены особенности в системе перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови у больных с ДОА тазобедренного сустава, что явилось основой для разработки алгоритма прогнозирования и диагностики нестабильности эндопротеза (Истомин С.Ю. 2008.).

Однако в современной литературе практически нет сведений, касающихся изучения процессов ПОЛ и окислительной модификации белков (ОМБ) при дегенеративно-дистрофических изменениях в суставах (ДДИС), связанных с исследованием СЖ. Таким образом, исследование СЖ и разработка прогностических критериев несовершенства строения внеклеточного матрикса артикулярных и параартикулярных тканей при развитии дегенеративно-дистрофических процессов в суставе являются актуальными и перспективными, необходимость их внедрения в практику не вызывает сомнений. Исходя из вышесказанного, были определены цель и задачи исследования.

Цель исследования - выявление особенностей изменения показателей перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков

синовиальной жидкости при развитии дегенеративно-дистрофических изменений в суставах в зависимости от стадии и этиологии процесса.

Задачи исследования:

1. Определить показатели белкового и липидного спектра, ПОЛ и ОМБ в синовиальной жидкости и сыворотке крови у экспериментальных животных в норме и при моделировании ранних и поздних стадий дегенеративно-дистрофических поражений суставов.
2. Определить показатели перекисного окисления в синовиальной жидкости крупных суставов в норме на резекционном материале. Провести сравнительный анализ показателей процессов пероксидации синовиальной жидкости крупных суставов (на примере синовиальной жидкости коленного и локтевого сустава).
3. Изучить изменение показателей ПОЛ и ОМБ в синовиальной жидкости и сыворотке крови больных с дегенеративно-дистрофическими поражениями крупных суставов на ранних и поздних стадиях процесса (идиопатический гонартроз I-II стадии, идиопатический гонартроз III стадии).
4. Провести сравнительный анализ показателей пероксидации синовиальной жидкости больных с остеоартрозом различной этиологии (идиопатической, посттравматической, диспластической).
5. Определить возможные критерии прогноза развития нестабильности компонентов эндопротеза при первичном эндопротезировании коленного сустава.

Новизна исследования:

Впервые определены референсные значения показателей пероксидации, показателей липидного и белкового обмена, активности каталазы в СЖ крупных суставов людей в норме. Сравнительным анализом установлено, что биохимический состав СЖ здоровых коленных и локтевых суставов человека имеет различия в концентрациях общего белка, общих липидов, холестерина, триглицеридов, а также в концентрации вторичных продуктов ОМБ – кетонов.

Новыми данными являются результаты исследования изменений в процессах пероксидации липидов и белков СЖ коленных суставов при развитии ДДИС, полученные на экспериментальном и клиническом материале. Показано, что при ДДИС травматической, диспластической и идиопатической этиологии накопление продуктов пероксидации происходит с преобладанием первичных метаболитов – альдегидов и диеновых конъюгатов.

Впервые определены различия между значениями использованных лабораторных тестов у пациентов со стабильным и нестабильным эндопротезом. Эти данные обосновывают значимость определения продуктов липопероксидации и активности каталазы в синовиальной жидкости для прогнозирования нестабильности при первичном эндопротезировании коленного сустава.

Теоретическая и практическая значимость:

Результаты работы обосновывают целесообразность исследования показателей перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в синовиальной жидкости в клинической лабораторной диагностике дегенеративно-дистрофических поражений суставов для оценки выраженности патологического процесса. Определение продуктов липопероксидации и активности антиокислительного фермента каталазы позволяет повысить объективность оценки состояния суставной среды и определить риск развития нестабильности эндопротезов при первичном эндопротезировании коленного сустава. Основные теоретические положения работы могут быть использованы в лекционных курсах «Клиническое значение исследования синовиальной жидкости» для слушателей институтов усовершенствования врачей и специалистов учреждений ортопедотравматологического профиля.

Методология и методы исследования:

Данная работа выполнена на базе лаборатории биохимии и клинико-экспериментального лабораторного отдела ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России». На проведение исследований получено разрешение комитета по этике при ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России». Согласно требованиям, которые изложены в «Европейской

конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях», и приказом Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 N 708н "Об утверждении Правил лабораторной практики" (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 N 18713), осуществляли содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию, с соблюдением гуманного отношения к объектам изучения и всех этических норм. Содержание экспериментальных животных производили в условиях вивария в отдельных вольерах, обеспечивая сбалансированным полноценным готовым рационом.

Биохимические методы исследования:

Общее количество белка (ОБ) определяли биуретовым методом (наборы фирмы «Vital Diagnostic»), электрофоретическое разделение белковых фракций проводили, используя прибор для электрофореза Helena («BioSciens Europe» Англия). Продукты ОМБ в биологическом материале определяли в белковом осадке по реакции 2,4-динитрофенилгидразином. Первичные продукты альдегиды регистрировали при длинах волн 270 нм, 363 нм и 370 нм – (ОМБ₂₇₀), – вторичные продукты кетоны (ОМБ₃₆₃₊₃₇₀). Концентрацию продуктов ОМБ рассчитывают в единицах оптической плотности на мг белка (Вьюшин А.В. 2002.).

В качестве количественных маркеров глубины и степени патологического процесса использовали такие промежуточные вещества ПОЛ, как диеновые конъюгаты (ДК) и малоновый диальдегид (МДА). Содержание ДК исследовали спектрофотометрически по разности оптической плотности между опытной и контрольной пробами при длине волны 232 нм (Орехович В.Н. 1977.). Определение МДА проводили по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Концентрацию продуктов перекисного окисления рассчитывали на мг общих липидов (ОЛ), которые в свою очередь определяли с помощью наборов фирмы "Lachema" (Чехия). Концентрации холестерина (ХЛ) и триглицеридов (ТГ) определяли колориметрическим методом, основанным на определении концентрации вещества по интенсивности окраски раствором (наборы фирмы «Vital Diagnostic»). Активность фермента каталазы, определяли спектрофотометрически при длине волны 410 нм, выявляя способность образовывать стойкий окрашенный комплекс перекиси водорода с солями

молибдена (Королук М.А. 1988.). Результаты определения перекисного окисления липидов и белков были представлены в виде расчетного коэффициента суммы [ДК+МДА], [Альдегиды+Кетоны] и отношений [ДК/МДА], [Альдегиды/Кетоны].

Статистические методы исследования:

При выполнении работы статистическую обработку полученных данных проводили методом вариационной статистики, которая применяется для малых выборок. На репрезентативных выборках выполнена экспериментальная и клиническая часть работы, в которой исключены распределения выскакивающих вариантов и проверены на нормальность распределения. В работе проводили математическое планирование. В группах наблюдений рассчитывали медиану значений и интерквартильные размахи 0,25 и 0,75 персентили. Применение статистических методов, алгоритмов и методик, расчетных формул использовали по книге С. Гланца (Гланц С. 2008.).

Вычислялся показатель линейной корреляционной связи Пирсона (r). Достоверность различий в сравниваемых группах оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона, пользуясь при этом лицензионными программами (Гайдышев И.П. 2004.). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту:

1. В биохимическом составе синовиальной жидкости коленных и локтевых суставов человека в норме существуют различия в показателях общего белка и общих липидов, липидного спектра и окислительной модификации белков.
2. При развитии дегенеративно-дистрофических изменений в суставах в синовиальной жидкости выявляется накопление продуктов липопероксидации и перераспределение продуктов окислительной модификации белков, которые зависят от тяжести патологического процесса, но не зависят от его этиологии.
3. Показатели перекисного окисления липидов и активности антиоксидантного фермента каталазы могут быть использованы в качестве критериев прогноза развития нестабильности эндопротеза у пациентов после первичного эндопротезирования коленного сустава.

Степень достоверности и апробация работы:

Работа выполнена на достаточном по объёму фактическом материале с использованием современных биохимических методов исследования.

Материалы диссертации доложены на научно-практическая конференция «Лабораторная наука – практике: первое десятилетие XXI века» (Москва 2009); «Технологии и инновации в лабораторной медицине» (Москва 2009); «VIII конгресс Российского артроскопического общества» (Москва 2009); «Всероссийский IX съезд травматологов-ортопедов, посвященный 200-летию Пирогова» (Саратов 2009); «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии» (Челябинск 2009); «Актуальные вопросы хирургии верхней конечностей» (Курган 2009); «Заседание областного общества ортопедов травматологов» (Курган, 2009), (Курган 2013); Международная научно-практическая конференция «Остеопороз и остеоартроз – проблема XXI века» (Курган 2009); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Илизаровские чтения» (Курган 2010).

Личный вклад автора:

Автором произведен информационный поиск по данной тематике. Представленный в диссертации материал обработан и проанализирован лично автором. Автором полностью выполнены методики изученных биохимических показателей у 384-х пациентов и 30 беспородных собак. Соискатель принимал непосредственное участие в сборе материалов для исследования, в проведении биохимических анализов и обработке полученных результатов. Выполнена компьютерная обработка полученных данных и статистический анализ. Автор принимал непосредственное участие в подготовке и написании статей.

Публикации:

По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, из них - 7 в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационного исследования.

Объем и структура работы:

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 238 работ (из них 179 - отечественные, 59 - зарубежные); изложена на 121 страницах машинописного текста, иллюстрирована 7 рисунками и 24 таблицами.

Диссертационная работа выполнена в составе темы НИР номер государственной регистрации 036/2-19 Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова Минздрава России», Курган.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальное моделирование остеоартроза (ОА) проводили на взрослых беспородных собаках. Основным материалом исследования являлась синовиальная жидкость коленных суставов и сыворотка крови 30 беспородных собак: интактных (n=10), с моделью дегенеративно-дистрофических поражений суставов (n=20) на ранних стадиях (28 суток эксперимента, n=14) и с моделью дегенеративно-дистрофических поражений суставов на поздних стадиях заболевания (56 суток эксперимента, n=6). Используемая экспериментальная модель подразумевала компрессию суставных поверхностей коленного сустава с созданием ишемического компонента путем пересечения бедренной артерии (Патент 2452999 РФ, МПК G 09B23/28 Способ моделирования остеоартроза коленного сустава / Макушин В.Д., Степанов М.А., Ступина Т.А. №2011104885/14; Заявл. 09.02.2011, Опубл.10.06.2012, Бюл., №16.). Критерием сроков эксперимента служила клинико-рентгенологическая характеристика состояния суставов. Коленные суставы собаки и человека сходны по анатомическому строению, типу регенерации хряща и расположению, что считается важным при экстраполяции экспериментальных данных (Деревянко И.В. 2004.). Следовательно, данный выбор животных представляется возможным и наиболее удобным для моделирования дегенеративных изменений. Согласно классификациям основных периодов развития дегенеративно-дистрофических изменений в суставах начальные изменения в суставах

экспериментальных животных соответствуют наиболее раннему периоду развития патологического процесса у человека (Макушин В. Д. с соавт., 2005.).

Исходя, из задач исследования клинический материал был распределен на следующие группы:

I клиническую группу составил материал от 45 больных с идиопатическим гонартрозом коленного сустава I-II стадии: мужчин – 27 и женщин - 18, средний возраст составил $69,3 \pm 2,6$ лет.

II клиническую группу составил материал от 293 больных с идиопатическим гонартрозом III стадии: мужчин - 78 и женщин – 215, средний возраст $73,0 \pm 2,3$ лет.

В III клинической группе был изучен состав синовиальной жидкости от 30 пациентов с повреждением мениска или крестообразной связки. В группу пациентов вошли: мужчин - 19 и женщин - 11, средний возраст которых составил $61,3 \pm 2,1$ лет.

В IV клинической группе представлен материал синовиальной жидкости 16 больных с артрозом диспластической этиологии коленного сустава. Данную группу составили: мужчин - 4 и женщин – 12, средний возраст $57,2 \pm 2,2$ лет.

V клиническую группу составил материал от 217 пациентов из числа обследованных, которые были прооперированы по поводу первичного эндопротезирования коленного сустава. Из них 208 пациентов со стабильным эндопротезом: мужчин - 96 и женщин – 112, средний возраст $71,4 \pm 2,8$ и 9 пациентов с нестабильностью эндопротеза: мужчин - 2 и женщин – 7, средний возраст $67,4 \pm 3,1$ лет. Группа больных с нестабильностью эндопротеза была выделена в течение срока нашего исследования, а именно, в течение 3 года.

Контрольную группу составили 45 образцов резекционного материала от 30 трупов внезапно погибших людей обоего пола: мужчин - 19 и женщин – 11, средний возраст $55,3 \pm 1,6$ лет (30 образцов синовиальной жидкости коленного сустава и 15 образцов локтевого сустава).

Кроме того, были исследованы образцы сыворотки крови 50 больных с дегенеративно-дистрофическими изменениями: мужчин - 21 и женщин - 29,

средний возраст которых составил $59,3 \pm 2,6$ лет. В рамках анализа клинико-диагностической лаборатории для релевантного лабораторного контроля суставной патологии была исследована сыворотка крови больных данной группы. Также были получены результаты образцов сыворотки крови 10 здоровых добровольцев: мужчин - 4 и женщин – 6, средний возраст $58,5 \pm 1,8$ лет. В них были определены биохимические показатели перекисного окисления липидов и белков.

Все пациенты, участвовавшие в исследовании дали информативное добровольное согласие на медицинское вмешательство и публикацию данных, полученных в результате исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования показателей перекисного окисления в синовиальной жидкости и сыворотке крови в эксперименте на животных с моделью дегенеративно-дистрофических изменений коленного сустава.

На основании результатов исследования СЖ экспериментальных животных нами отмечено, что на ранних стадиях развития дегенеративно-дистрофического процесса в суставе концентрации ОЛ и ХЛ остаются на дооперационном уровне, но имеют место изменения в липидном спектре синовии – статистически значимое возрастание количества ТГ. Концентрация ДК – промежуточного продукта пероксидации возрастает относительно нормальных значений в 2 раза, а концентрация вторичного продукта, МДА, снижается в 3 раза относительно нормы. Активность одного из ключевых ферментов антиоксидантной защиты – каталазы - оставалась в пределах нормальных значений. Расчетный коэффициент суммы продуктов ПОЛ [ДК+МДА] понижался, т.к. была понижена концентрация вторичных продуктов ПОЛ - МДА. Расчет соотношения первичных и вторичных продуктов ПОЛ [ДК/МДА] показал его увеличение, что говорит об их перераспределении с уменьшением доли вторичных продуктов ПОЛ - МДА и повышением содержания первичных продуктов - ДК.

Концентрация общих липидов СЖ при моделировании ОА на более поздних стадиях развития заболевания была статистически значимо повышена. В показателях липидного спектра выше нормальных значений отмечены показатели концентраций ХЛ и ТГ. Концентрация ДК повышалась в 3 раза, а концентрация МДА снижалась в 2 раза относительно нормальных значений. Активность каталазы оставалась практически без изменений. Расчет коэффициентов суммы [ДК+МДА] и соотношения [ДК/МДА] первичных и вторичных продуктов ПОЛ показало их возрастание, что говорит о накоплении продуктов ПОЛ и преобладании первичных продуктов - ДК (Рисунок 1).

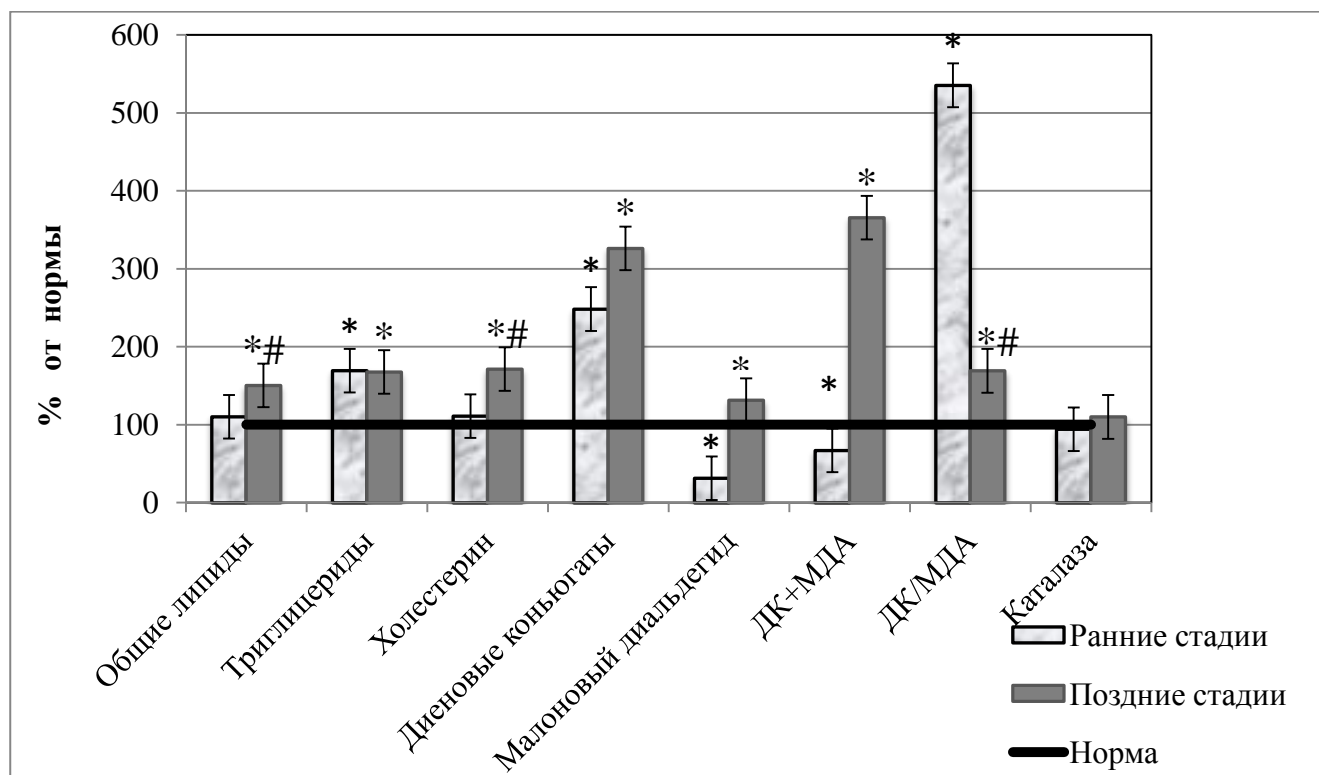


Рисунок 1. Биохимические показатели липидного спектра продуктов пероксидации и активности каталазы в синовиальной жидкости коленных суставов собак при моделировании ОА на ранних и поздних стадиях ДДИС

Здесь и далее * - различия статистически значимы с уровнем значимости $p \leq 0,05$ относительно нормы

Здесь и далее # - различия статистически значимы с уровнем значимости $p \leq 0,05$ между группами

При развитии ДДИС концентрация ОБ значительно возрастает (Рисунок 2). Количество первичных продуктов пероксидации белка на ранних стадиях эксперимента снижено по показателю абсолютных значений альдегидов. Также статистически значимо снижена концентрация кетонов. Сумма продуктов ОМБ

[Альдегиды+Кетоны] статистически значимо снижалась относительно нормы, а их соотношение [Альдегиды/Кетоны] показало, что в гораздо большей степени снизился показатель альдегидов.

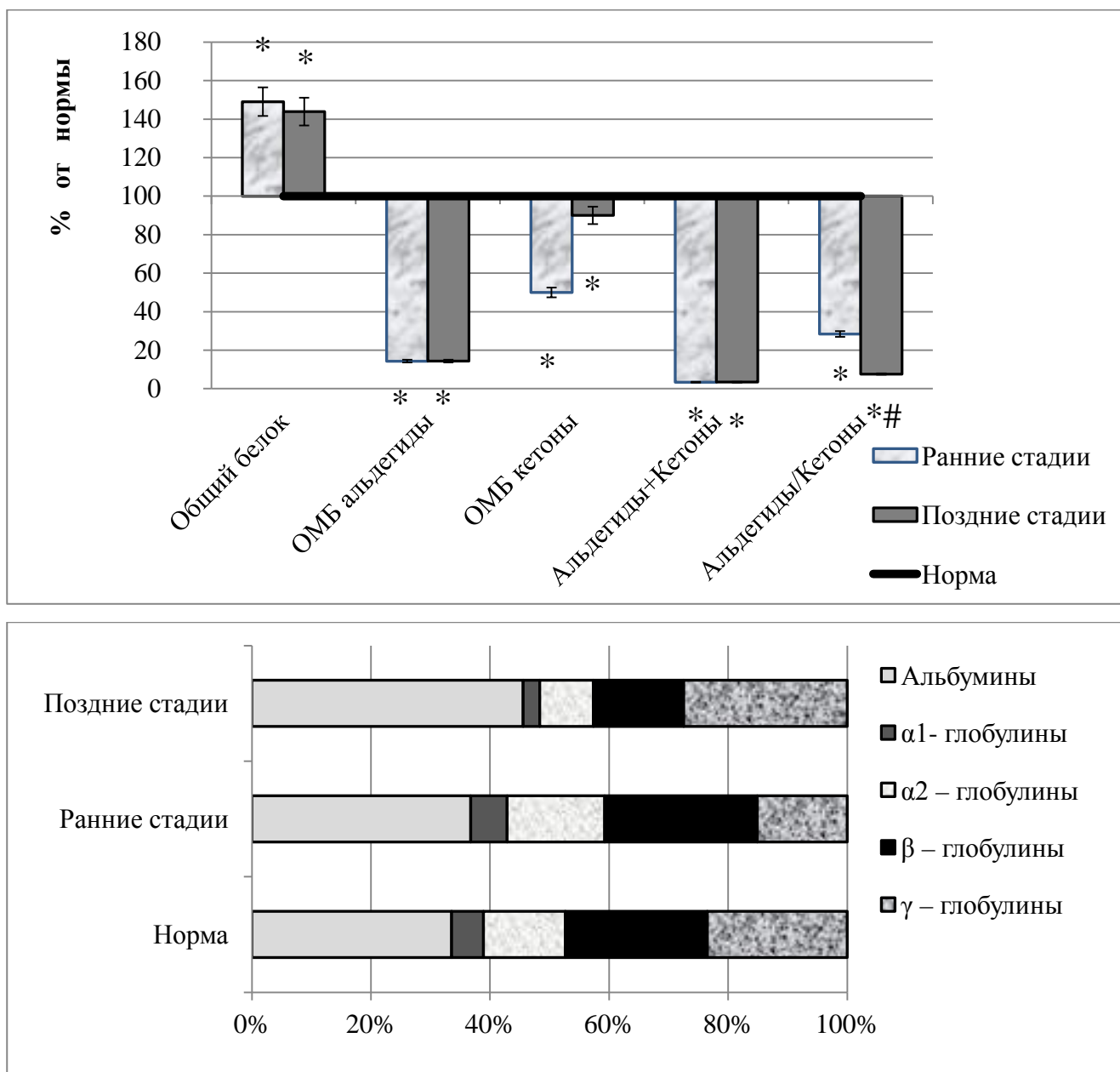


Рисунок 2. Биохимические показатели ОМБ и состав белковых фракций в синовиальной жидкости коленных суставов собак при моделировании ОА на ранних и поздних стадиях ДДИС *Примечание – См. на рис. 1*

На поздних стадиях развития патологии в СЖ происходит значительное накопление продуктов пероксидации липидов. Очевидно, окислительный стресс проявляется в генерации широкого спектра свободнорадикальных продуктов ПОЛ.

Исследование белкового спектра на ранних стадиях не выявило отличий от нормальных значений, а на поздних стадиях показало статистически значимое снижение концентрации фракций α_1 -глобулинов, α_2 -глобулинов и β -глобулиновой фракции. Значимое снижение концентраций этих фракций компенсируется увеличением концентрации γ -глобулиновой фракции, что характеризовало процесс как хронический. На поздних стадиях эксперимента концентрация ОБ статистически значимо повышалась, а концентрации продуктов ОМБ также имели статистически значимо сниженные показатели.

Биохимические исследования сыворотки крови на ранних стадиях развития заболевания показали статистически значимое повышение концентрации продуктов ПОЛ, и соответственно, превышение суммарной концентрации продуктов пероксидации липидов [ДК+МДА], но снижение в 1,5 раза продуктов ОМБ, что свидетельствует о дисбалансе продуктов пероксидации липидов и белков, накоплении свободнорадикальных соединений липидной природы (Рисунок 3).

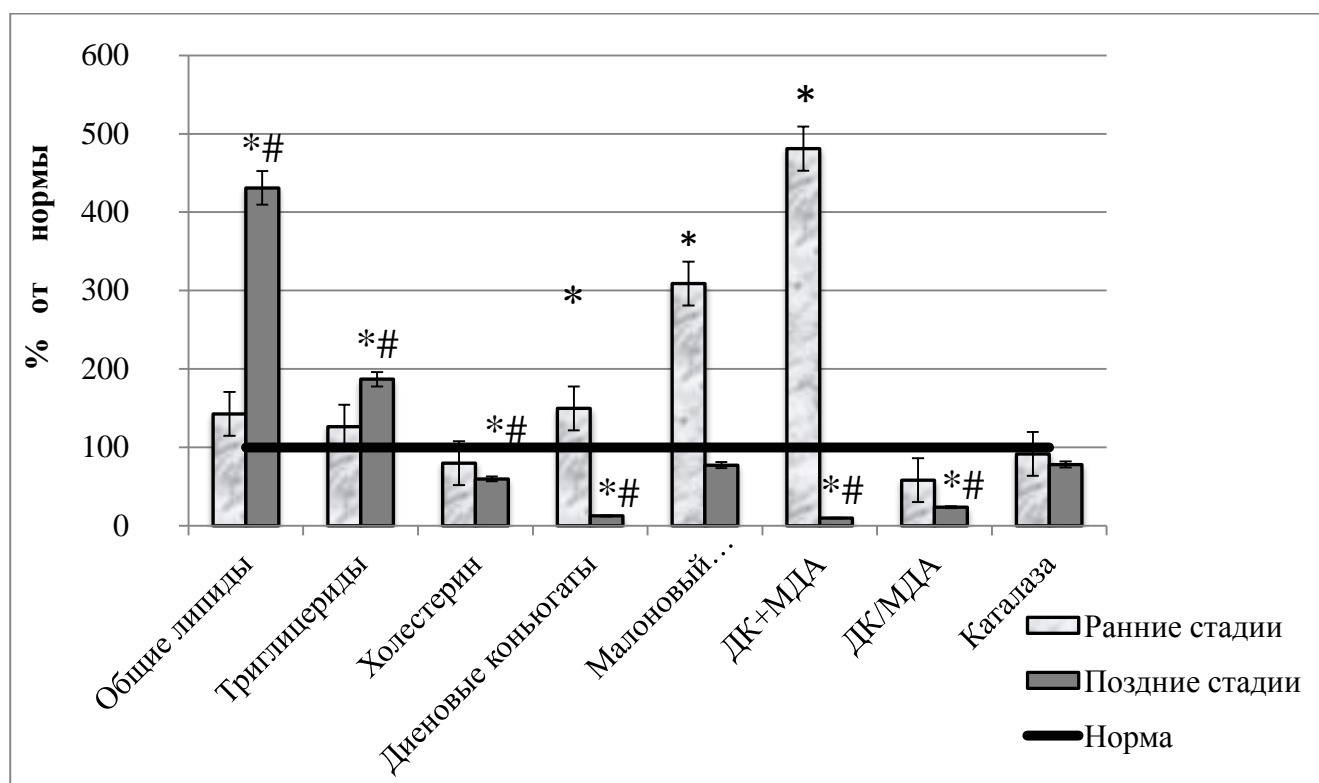


Рисунок 3. Биохимические показатели липидного спектра, продуктов ПОЛ и активности каталазы в сыворотке крови собак при моделировании ОА на ранних и поздних стадиях ДДИС *Примечание – См. на рис. 1*

На поздних стадиях ОА изменения биохимического состава сыворотки крови были более выражены: в 3,5 раза повышена концентрация ОЛ, в 2 раза концентрация ТГ. Отмечено значительное (в 8 раз) понижение концентрации ДК, и некоторое, (на 23%) понижение содержания МДА, чего мы не наблюдали на ранних стадиях развития ОА. Активность основного антиоксидантного фермента – каталазы оставалась без изменений.

Отмечено, что у собак на разных стадиях суставной патологии изучаемые показатели в сыворотке крови отличались от контрольной группы и имели свои особенности (Рисунок 4).

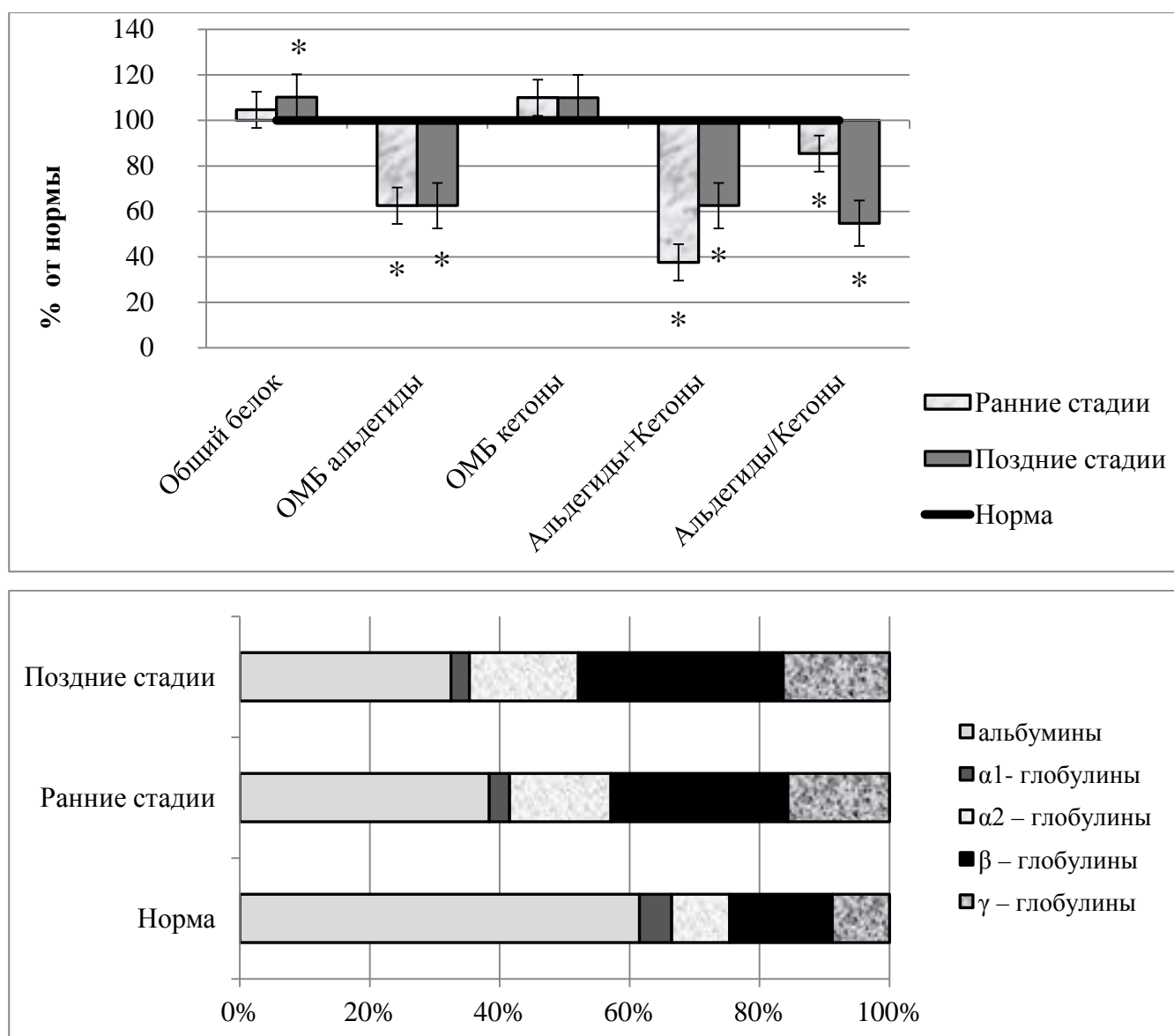


Рисунок 4. Биохимические показатели общего белка, продуктов ОМБ и состав белковых фракций в сыворотке крови собак при моделировании ОА на ранних и поздних стадиях ДДИС *Примечание – См. на рис. 1*

Концентрация первичных продуктов ОМБ – альдегидов статистически значимо снижались с уровнем значимости $p < 0,05$. Известно, что данный продукт образует с аминок группами белка шиффовы основания, выступая при этом «сшивающим» агентом. В результате «сшивки» образуются нерастворимые «комплексы-пигменты» изнашивания или конечные продукты окисления внутри клеточных белков. Однако, содержание вторичных продуктов перекисидации белков – кетонов - находилось на дооперационном уровне. Рассмотрев расчетные коэффициенты суммы [Альдегиды+Кетоны] и соотношения [Альдегиды/Кетоны], следует отметить их снижение.

Результаты исследований, проведенных нами в сыворотке крови собак на поздних стадиях, показали, что концентрация ОБ была выше контрольных значений. Концентрация продуктов ОМБ статистически значимо понижалась только в первичных продуктах – альдегидах, концентрация вторичных продуктов – кетонов - оставалась без изменений. Соответственно, в виду снижения концентрации первичных продуктов ОМБ были снижены и расчетный коэффициент [Альдегиды+Кетоны], и соотношение [Альдегиды/Кетоны].

На ранних стадиях развития ДДИС в сыворотке крови собак наблюдалась диспротеинемия. Снижение альбумина может быть связано с некоторой потерей белка, что может быть обусловлено острым воспалением, а именно об этом говорит повышение α_2 -глобулиновой фракции. Повышение фракции γ -глобулинов непосредственно указывает на развитие ДДИС. При развитии ДДИС была статистически значимо снижена концентрация α_1 -глобулиновой фракции. На поздних стадиях процесса она была снижена в большей степени. На поздних стадиях возрастание α_2 -глобулиновой, β -глобулиновой и γ -глобулиновой фракций указывает на наличие воспалительного процесса и хронической формы заболевания. Следует отметить, что изменения в липидном и белковом спектрах, в концентрациях продуктов перекисидации в СЖ при развитии патологических процессов происходят раньше чем в сыворотке крови.

Результаты исследований показателей пероксидации в синовиальной жидкости и сыворотке крови больных с дегенеративно-дистрофическими изменениями в суставах.

Для проведения сравнительного анализа биохимических показателей состава СЖ было необходимо исследование образцов синовии людей, не имеющих суставной патологии. Состав СЖ других суставов, кроме коленных, не был исследован, а в доступной нам литературе мы не обнаружили подобных сведений. На основании проведенного исследования, было установлено, что в СЖ коленных и локтевых суставов не наблюдается полной идентичности биохимического состава (Рисунок 5).

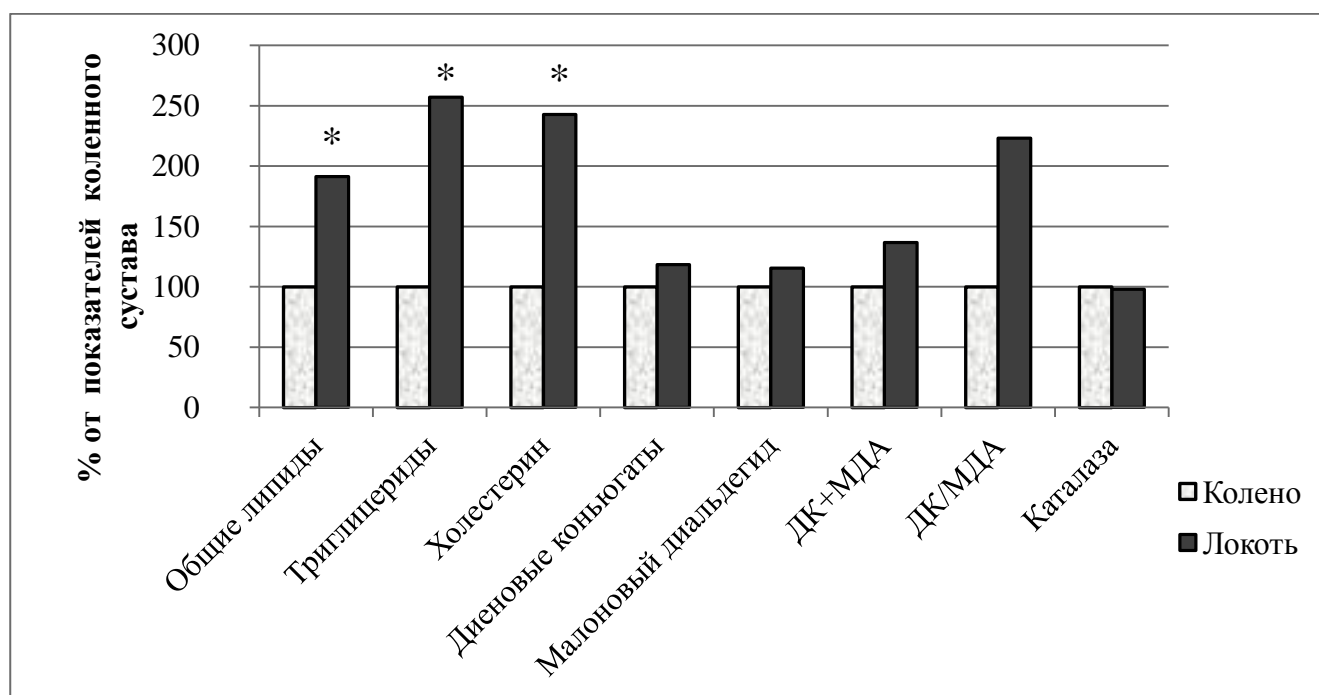


Рисунок 5. Сравнительная характеристика концентрации липидного спектра, АОС, продуктов ПОЛ в синовиальной жидкости коленного и локтевого сустава человека в норме

Концентрация ОЛ синовии локтевого сустава статистически значимо превышает таковые в коленных суставах. Также было отмечено, что концентрации показателей липидного обмена (ХЛ, ТГ) была ниже в коленном суставе. Показатели ПОЛ как в коленном, так и в локтевом суставе не имели каких-либо различий, что можно сказать и о расчетном коэффициенте [ДК+МДА]

и соотношении [ДК/МДА]. Активность антиоксидантного фермента – каталазы – находилась на одном уровне.

Таким образом, были обнаружены статистически значимые различия в концентрациях ХЛ, ТГ, ОЛ, ОБ и продуктов ПОЛ – все концентрации статистически значимо снижены в коленном суставе.

В продуктах ОМБ различия между коленными и локтевыми суставами имели только вторичные продукты ОМБ – кетоны, которые были статистически значимо повышены в коленном суставе (Рисунок 6).

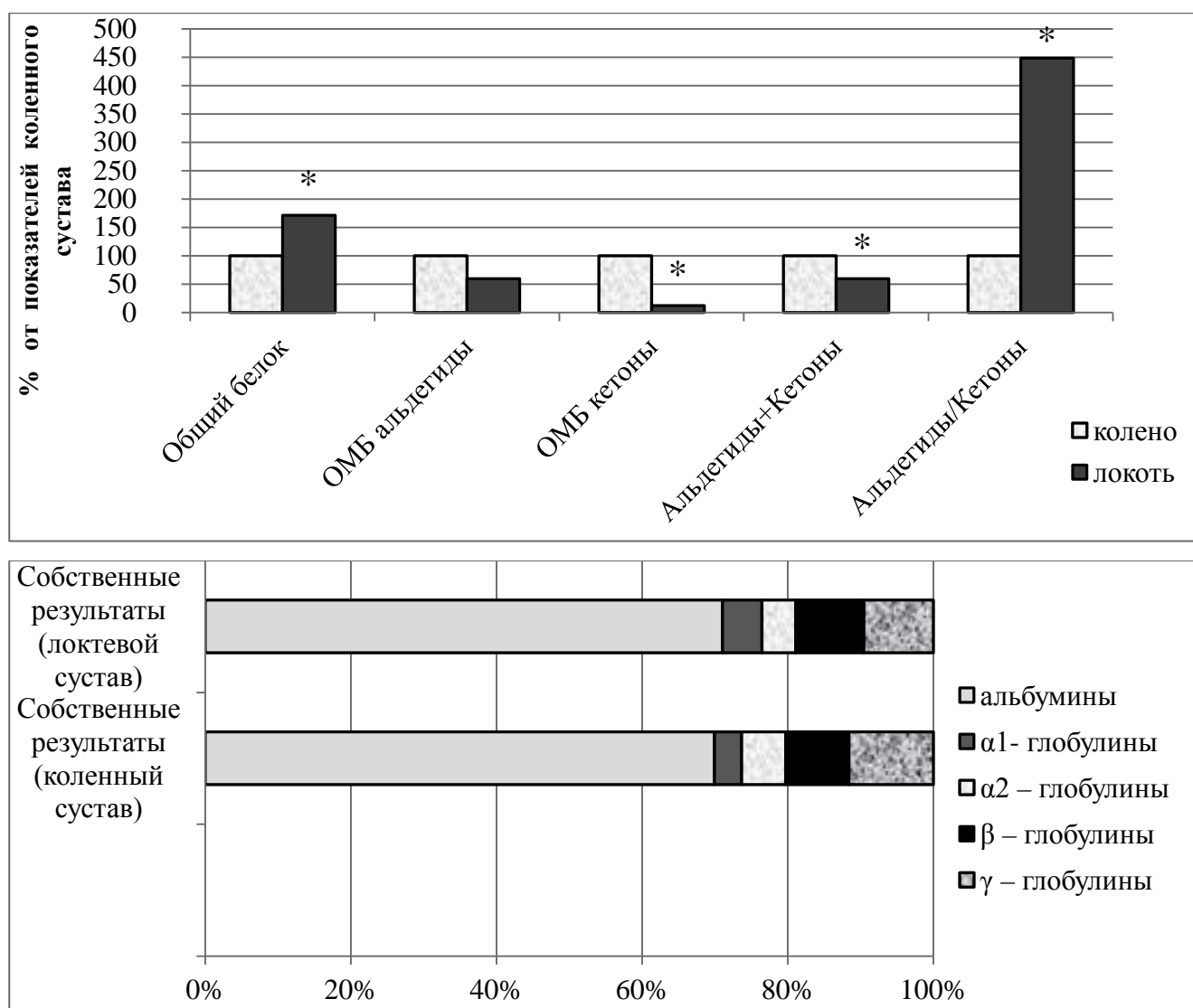


Рисунок 6. Сравнительная характеристика концентрации продуктов ОМБ и белковых фракций в синовиальной жидкости коленного и локтевого сустава человека в норме

Исходя из представленных на рисунке 6 данных видно, что существуют некоторые различия в составе СЖ разных суставов человека. Не наблюдалось статистически значимых отличий в значениях альбумин-глобулинового коэффициента, однако, они имелись в содержании белковых фракций.

При определении референсных значений биохимического состава СЖ, очевидно, следует учитывать строгую взаимосвязь между формой, размером, характером движений и содержанием суставной среды, которая обусловлена разной степенью загруженности сустава. Смазочные свойства среды в разных шарнирных устройствах должны иметь разные физико-химические характеристики и, соответственно, отличаться по биохимическому составу.

Для выполнения задач, поставленных в нашей работе, мы исследовали аналогичные биохимические показатели СЖ и сыворотки крови на клиническом материале у больных с разной этиологией заболевания и при разных стадиях развития патологического процесса.

В диагностике заболеваний суставов исследование СЖ имеет существенное значение. Синовиальная жидкость, является основным органоспецифичным компонентом каждого сустава. Она отвечает за физико-химические свойства и биохимический состав, реагирует на любые внутрисуставные процессы. Эффективность как оперативного, так и консервативного лечения при дегенеративных заболеваниях суставов показывает, что используемый метод терапии во многом зависит не только от выбранного метода лечения, но и от компенсаторной возможности организма.

При развитии идиопатического гонартроза (ИГ) I-II стадии в СЖ больных мы обнаружили повышение в 2 раза концентрации ОЛ, в 2,5 раза - ХЛ, и снижение концентрации ТГ в 5 раз. Такую же закономерность мы обнаружили в СЖ больных и с ИГ III стадии. Концентрация продуктов липопероксидации была статистически значима выше показателей нормы, как на ранних, так и на поздних стадиях ИГ, в основном за счет накопления первичных продуктов пероксидации липидов. Активность каталазы оставалась без изменения (Рисунок 7).

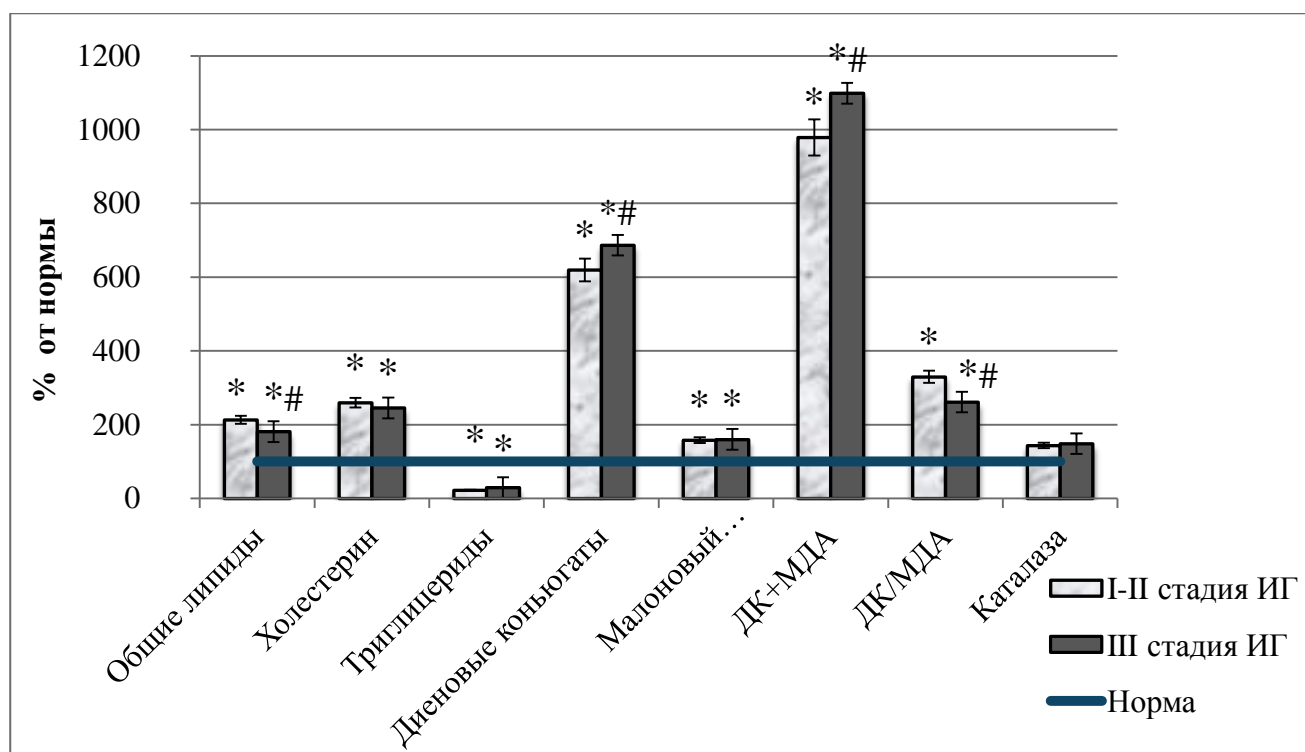


Рисунок 7. Биохимические показатели липидного обмена и системы ПОЛ-АОС при развитии идиопатического гонартроза (ИГ) на ранних и поздних стадиях
Примечание – См. на рис. 1

Увеличение содержания ОБ в СЖ наблюдается при подавляющем большинстве заболеваний, протекающих с явлением синовита (Рисунок 8). В процессе ОБ при развитии заболевания от ранних к поздним стадиям происходит накопление альдегидов: в 2 раза на I-II стадиях и в 4 раза на III стадии заболевания. Вторичные продукты ОБ на ранних стадиях и поздних стадиях снижаются в 2,5 раза. Однако, на III стадии процесса в СЖ происходит накопление продуктов ОБ за счет повышения концентрации альдегидов. Перераспределение белковых фракций СЖ больных было совершенно идентично как на ранних, так и на поздних стадиях ИГ. Оно выражалось в понижении α -глобулиновых фракций и повышении фракции β -глобулинов. Полученные нами результаты указывают на выраженные признаки окислительного повреждения липидов и белков в СЖ при развитии ИГ.

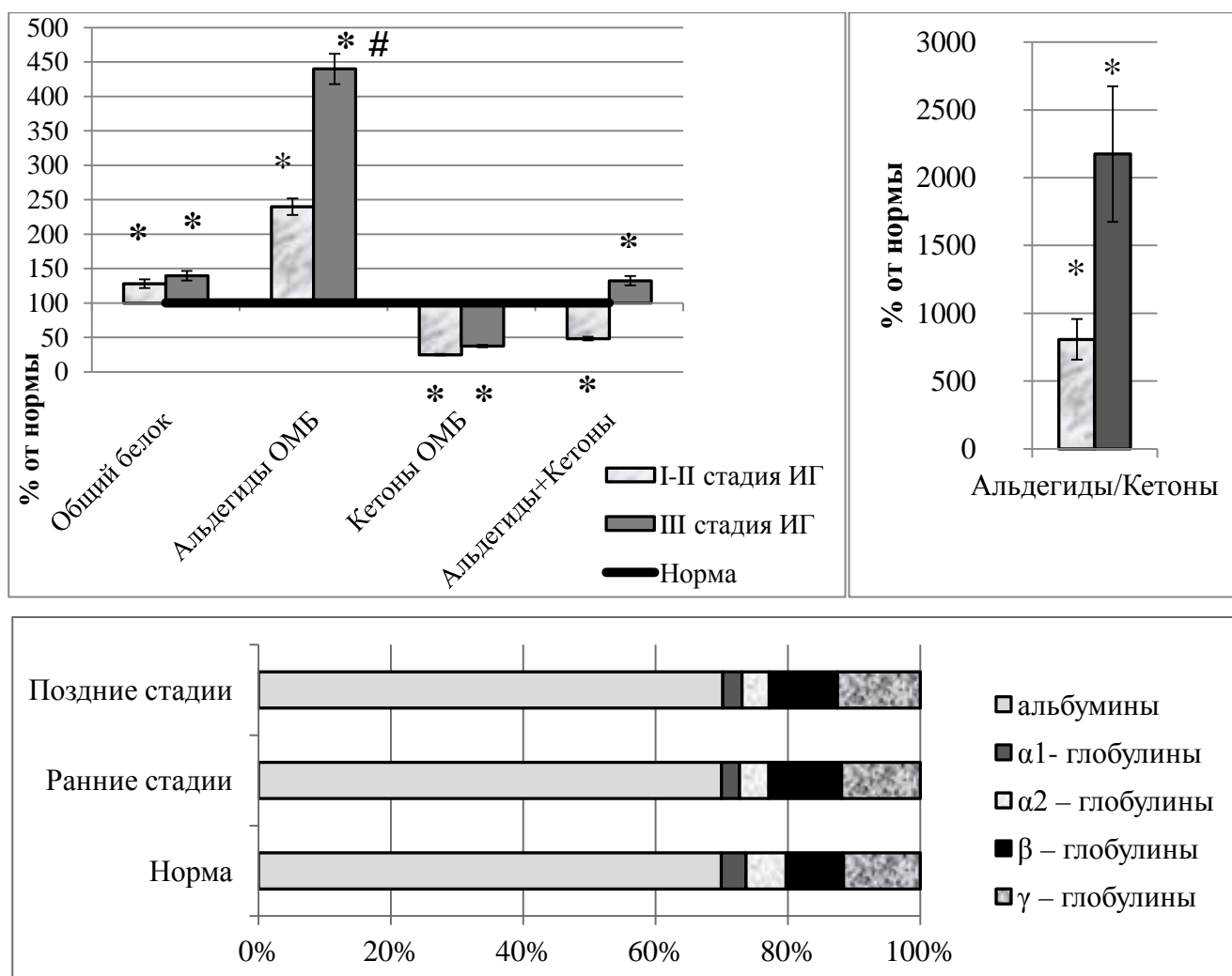


Рисунок 8. Биохимические показатели общего белка, продуктов ОМБ и состав белковых фракций при развитии идиопатического гонартроза (ИГ) на ранних и поздних стадиях *Примечание – См. на рис. 1*

Анализируя показатели оксидантного статуса, отмечаем, что концентрации ДК и МДА достигали максимальных значений, превышающих контрольные в несколько раз на поздних стадиях развития заболевания. Накопление продуктов ПОЛ и ОМБ в синовиальной жидкости больных при идиопатическом гонартрозе на разных стадиях заболевания является результатом свободнорадикального окисления липидов и белков и происходит одновременно с разбалансировкой систем, регулирующих интенсивность пероксидации. Оценка свободнорадикального гомеостаза СЖ продемонстрировала сдвиг равновесия в сторону накопления первичных продуктов активных кислородных метаболитов.

По полученным нами данным в сыворотке крови больных гонартрозом на разных стадиях развития заболевания имеют место изменения биохимических показателей липидного обмена (Таблица 2).

Таблица 2. Биохимические показатели липидного обмена сыворотки крови больных остеоартрозом на разных стадиях заболевания

Показатели	Норма	I стадия гонартроза	II стадия гонартроза	III стадия гонартроза
Холестерин (ХТ) ммоль/л	5,87 (4,62;6,55)	6,16 (5,04;7,42)	6,85^{0,05}## (5,33;7,97)	8,00^{0,01}# (7,06;9,60)
Триглицериды (ТГ) ммоль/л	0,41 (0,14;1,82)	0,88 (0,60;1,30)	1,16^{0,05}## (0,82;1,60)	1,73^{0,05}# (1,38;2,00)
Общие липиды (ОЛ) г/л	4,56 (3,43;8,01)	4,75 (3,92;5,83)	5,05 (4,29;5,94)	5,20 (4,40;7,91)

Примечание: Верхний индекс – уровень значимости (р) по сравнению с нормой;

#- различия статистически значимы между 1 и 3 стадией заболевания;

- различия статистически значимы между 2 и 3 стадией заболевания.

Несмотря на то, что концентрация ОЛ в сыворотке крови у больных гонартрозом на всех трех стадиях заболевания остается в пределах нормы, имеют место изменения уровня концентрации ХЛ и ТГ. На всех трех стадиях заболевания эти показатели последовательно возрастают, отличаясь от нормальных с разным уровнем значимости. Концентрация ХЛ в 1,4 выше у больных с III стадией заболевания по сравнению с начальной - I стадией. Аналогичные различия по стадиям процесса обнаружены для ТГ – они повышаются в 1,55 раза от I стадии к III-й.

Известно, что ДОА является заболеванием, этиология которого мультифакторна и до конца не изучена (Minkowitz R.B., 2009). Повреждения хряща суставных поверхностей коленного сустава и повреждения внутрисуставных структур зачастую имеют одинаковую клиническую картину, которая проявляется выраженным болевым синдромом. Артроз диспластической этиологии предполагает дегенеративно-дистрофических изменениях суставного

хряща на одной или обеих поверхностях надколенника и в области блока бедренной кости.

Полученные результаты исследования представлены на рисунке 9.

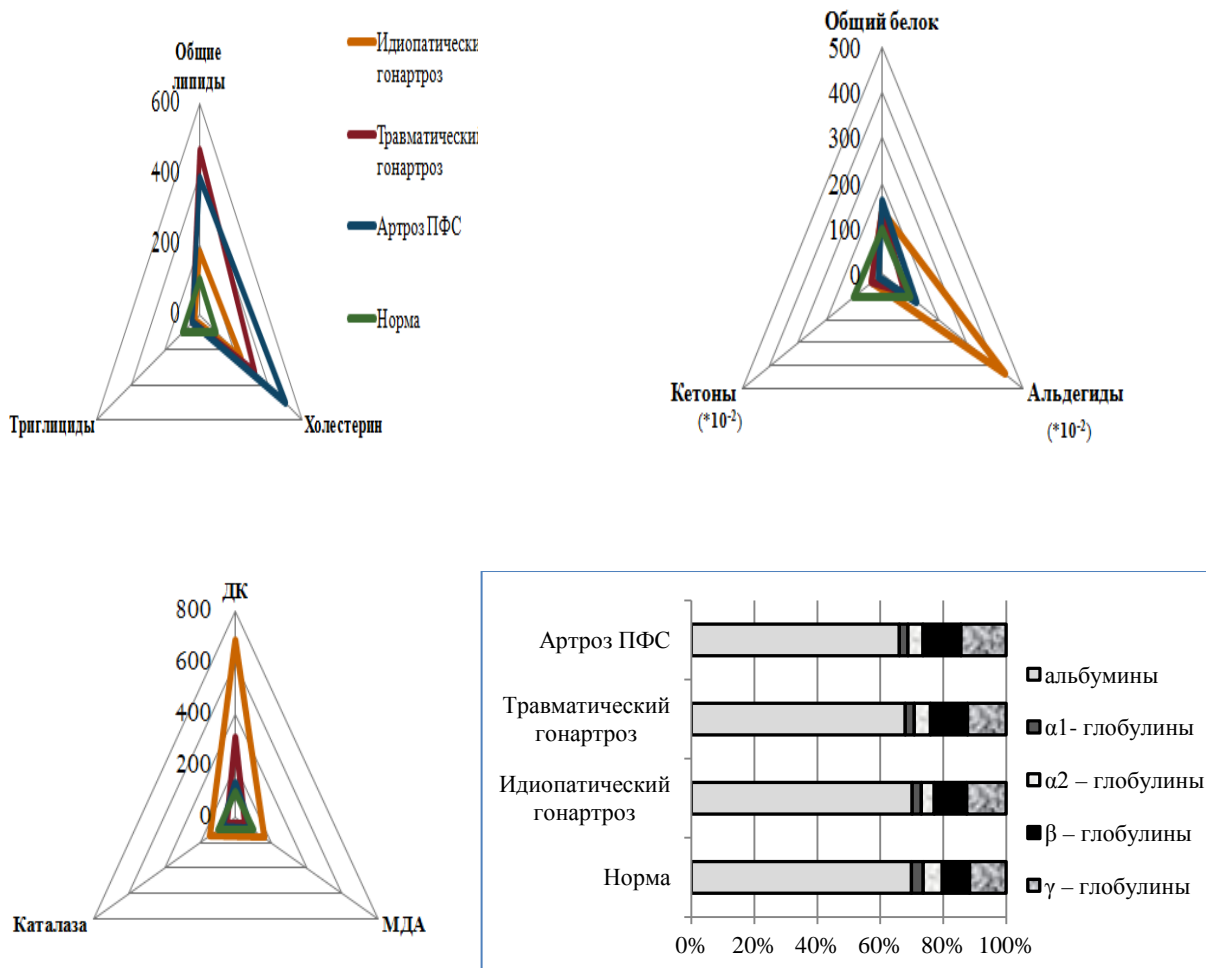


Рисунок 9. Биохимические показатели синовиальной жидкости больных с остеоартрозом различной этиологии (в % от нормы)

По полученным нами данным при ОА различной этиологии статистически значимо возрастала концентрация ОЛ синовии, изменение липидного спектра было одинаково выражено в повышении концентрации ХЛ и понижении концентрации ТГ и происходило перераспределение продуктов ПОЛ – значительно возрастала концентрация первичных продуктов ДК. При гонартрозе травматической этиологии статистически значимо снижена активность каталазы. В остальных группах незначимо, но снижена активность каталазы синовии, что свидетельствует, о том, что усиления окислительных процессов в синовии не

происходит. Показатели ОБ при развитии артрозного процесса возрастают так же во всех группах больных. В концентрациях продуктов ОМБ происходило многократное накопление альдегидов. Количество же кетонов во всех группах было статистически значимо ниже нормы. Белковый спектр показал однотипные изменения, выражающиеся в снижении α -глобулиновых фракций и повышении фракции β -глобулинов (Рисунок 9).

Таким образом, сравнительный анализ результатов проведенных исследований показал, что в результате ДДИС с любой этиологией (как идиопатической, так и посттравматической, диспластической) в СЖ происходит увеличение концентрации ОЛ и ОБ. Кроме того, изменяется спектр липидной и белковой составляющей синовии: отмечается повышение концентрации ХЛ и понижение концентрации ТГ, перераспределение концентрации белковых фракций с увеличением доли β -глобулинов и уменьшением α_1 - и α_2 -глобулиновых фракций.

В конечной точке развития ДДИС главной стратегией лечения является эндопротезирование. После первичного эндопротезирования, по литературным данным, благоприятные результаты отмечаются в 85 % случаев с горизонтом анализа 3 года (Kurtz S., et al.2007; Drees P. et al.2008). Однако по мере изучения отдаленных результатов количество положительных исходов существенно снижается, и это снижение закономерно связано с длительностью срока наблюдения за прооперированными больными. Группу больных, у которых была выявлена нестабильность эндопротеза, составил материал от 217 пациентов из числа обследованных, прооперированных по поводу первичного эндопротезирования коленного сустава. Данная группа была выделена в течение срока нашего эксперимента (3 года) и представлена 9 наблюдениями из 217 пациентов.

Биохимические показатели СЖ больных с нестабильным эндопротезом статистически значимо отличаются как от значений нормы, так и от показателей в группе больных со стабильным эндопротезом (Рисунок 10).

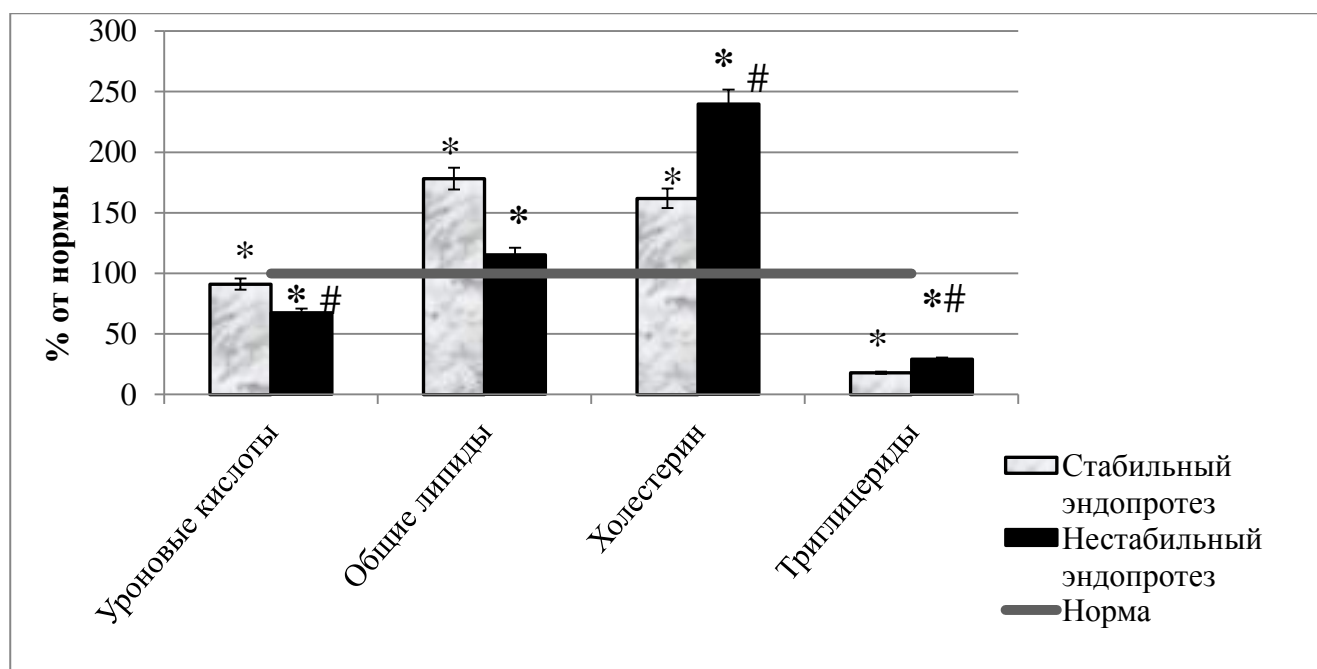


Рисунок 10. Липидный спектр синовиальной жидкости больных в группе пациентов с первичным эндопротезированием коленного сустава
Примечание – См. на рис. 1

В обеих группах снижена концентрация УК, причем в группе с нестабильностью эндопротеза снижена на 33 %, что больше чем у пациентов группы сравнения. Концентрация ОЛ в группе больных с нестабильностью эндопротеза повышена относительно нормальных значений в 2 раза; различия относительно группы стабильного эндопротеза статистически не значимы. Анализ изменений спектра липидов показал повышение концентрации ХЛ (в 4 раза относительно нормы и более чем в 2 раза – относительно группы стабильного эндопротеза). Концентрация ТГ снижена в 3,5 раза относительно нормы, но, тем не менее, она значимо выше, чем у пациентов со стабильным эндопротезом.

Сравнительный анализ результатов исследования концентрации продуктов пероксидации при нестабильности эндопротеза представлен на рисунке 11.

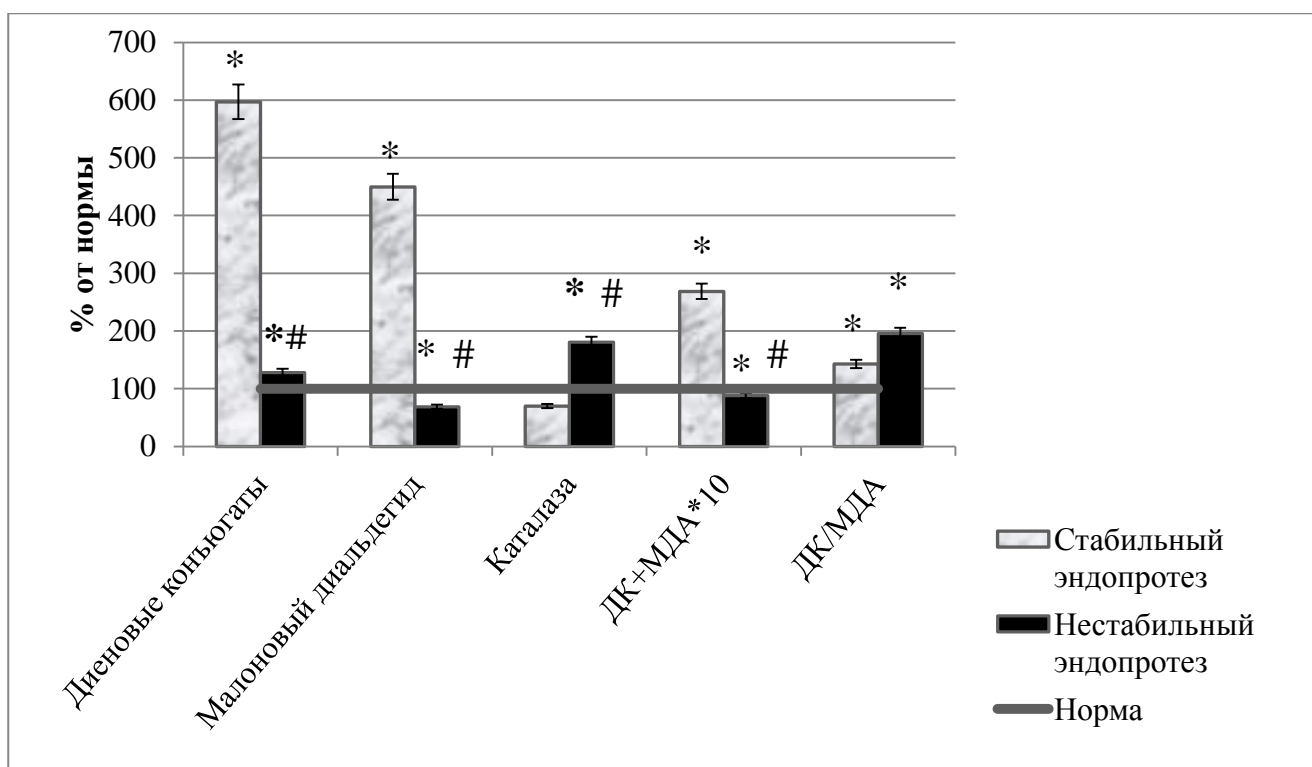


Рисунок 11. Процессы ПОЛ синовиальной жидкости больных в группе пациентов с первичным эндопротезированием коленного сустава *Примечание – См. на рис. 1*

При нестабильности эндопротеза уровень содержания продуктов пероксидации липидов резко понижается по сравнению с группой стабильного эндопротеза (в 4,5 раза для ДК и в 6,5 раз для МДА). В сравнении с нормальными значениями наблюдалось повышение концентрации первичных продуктов и статистически значимое понижение вторичных продуктов. Расчетный коэффициент [ДК+МДА] также имел отличия между группами больных. Если в группе пациентов со стабильным эндопротезом накопление суммарных продуктов пероксидации липидов значительно (почти в 18 раз) превышало нормальные значения, то в группе пациентов, у которых в дальнейшем развивалась нестабильность, этот показатель был даже ниже нормальных значений. В группе с нестабильностью компонентов эндопротеза соотношение [ДК/МДА] статистически значимо возрастало относительно нормы. Анализ активности антиоксидантного фермента каталазы в группе со стабильным эндопротезом не показал статистически значимых отличий от нормы, а в группе с нестабильностью активность каталазы была повышена почти в 2 раза.

В данных группах пациентов также были исследованы показатели продуктов ОМБ и белкового спектра (Рисунок 12).

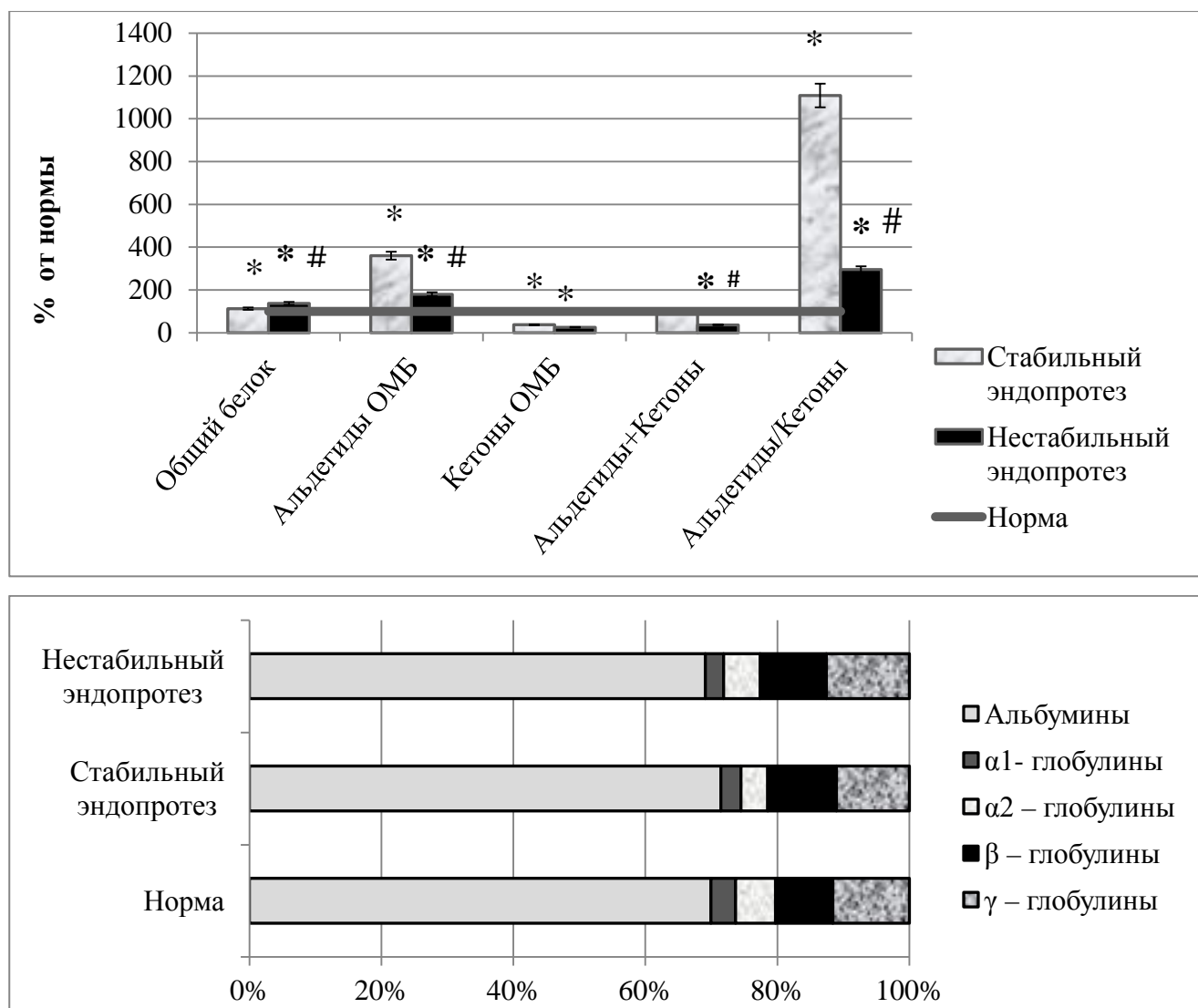


Рисунок 12. Биохимические показатели синовиальной жидкости больных с нестабильностью эндопротеза по результатам определения ОМБ и белкового спектра *Примечание – См. на рис. 1*

В СЖ пациентов с эндопротезированием коленного сустава показательно изменялась концентрация ОБ, которая последовательно возрастала относительно нормы в группах стабильного и нестабильного эндопротеза (от нормы - на 40%, от группы сравнения - на 22%). Концентрация альдегидов повышалась в 1,5 раза в группе стабильного эндопротеза относительно нормальных значений, но была в 2 раза ниже, чем у пациентов в группе с НЭ. группы сравнения. Концентрация кетонов была статистически значимо снижена (в 4 раза – от нормы и в 1,5 раза от группы стабильного эндопротеза). Расчетный коэффициент [Альдегиды+Кетоны]

был в 2 раза снижен по сравнению с нормой и в 3 раза от группы сравнения. Соотношение [Альдегиды/Кетоны] статистически значимо возрастало относительно нормальных значений в обеих группах исследования (почти в 10 раз в группе со стабильным, и в 3 раза – в группе с нестабильным эндопротезом); при этом в группе с нестабильностью эндопротеза это отношение было статистически значимо ниже, чем в группе сравнения.

Концентрация фракции α_2 -глобулины была повышена в группе с НЭ относительно группы сравнения и не имела достоверных отличий от нормы.

Таким образом, выделяя показатели с разнонаправленными изменениями в группах сравнения возможными критериями в прогнозировании нестабильности при эндопротезировании коленного сустава определены в СЖ показатели продуктов перекисного окисления липидов – МДА, суммарный показатель продуктов липопероксидации [ДК+МДА], а также активность антиокислительного фермента каталазы. Снижение показателей продуктов пероксидации при повышении активности основного фермента АОС - каталазы указывает на риск развития данного осложнения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было выявлено, что на разных стадиях экспериментального моделирования ДДИС происходят изменения в липидном и белковом спектре СЖ, липопероксидации и ОМБ. Полученные результаты показывают, что в СЖ патологически измененных суставов метаболические нарушения происходят раньше, чем в сыворотке крови. Биохимические показатели пероксидации СЖ больных ОА различной этиологии носят однонаправленный характер, а именно: происходит увеличение концентрации ОЛ и ОБ, перераспределение продуктов ПОЛ и ОМБ. Кроме того, изменяется спектр липидной и белковой составляющей синовии - повышается концентрация ХЛ, и снижается концентрация ТГ, происходит перераспределение белковых фракций с уменьшением α_1 - и α_2 -фракций и увеличением доли β -глобулинов.

Использование показателей биохимического исследования ПОЛ и ОМБ синовиальной жидкости в комплексе с клиническими и рентгенологическими данными позволит дать объективную оценку синовиальной среды при развитии суставной патологии, а также может служить критериями прогнозирования нестабильности эндопротеза коленного сустава.

ВЫВОДЫ:

1. В синовиальной жидкости крупных суставов человека определены референсные значения биохимических показателей липидного и белкового спектра, липопероксидации и окислительной модификации белков. Отмечены статистически значимые отличия в показателях общего белка и общих липидов, холестерина и триглицеридов, кетонов.
2. При развитии дегенеративно-дистрофических изменений в суставах в синовиальной жидкости экспериментальных животных снижается интенсивность окислительной модификации белков, но происходит накопление продуктов перекисного окисления липидов: на ранних стадиях - диеновых конъюгатов, на поздних стадиях - диеновых конъюгатов и малонового диальдегида.
3. У больных идиопатическим гонартрозом как на ранних, так и на поздних стадиях развития заболевания активируются процессы перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков. В синовиальной жидкости накапливаются продукты их пероксидации с преобладанием первичных продуктов – альдегидов и диеновых конъюгатов.
4. В синовиальной жидкости больных идиопатическим, посттравматическим и диспластическим остеоартрозом происходят однонаправленные изменения в составе продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков.
5. Повышение в синовиальной жидкости активности каталазы и снижение концентрации малонового диальдегида являются неблагоприятными прогностическими критериями, свидетельствующими о риске развития

нестабильности эндопротеза при первичном эндопротезировании коленного сустава.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При внедрении результатов проведенного исследования в клиническую практику нам представляется возможным рекомендовать:

1. Исследование липидного и белкового спектра, определение продуктов пероксидации липидов и белков целесообразно использовать для объективной оценки степени выраженности патологического процесса в суставе.
2. Использование нормативных показателей биохимического состава синовиальной жидкости необходимо производить с учетом локализации патологического процесса, дифференцируя показатели коленного и локтевого сустава.
3. Определение в синовиальной жидкости показателей перекисного окисления липидов и активности каталазы могут быть использованы как дополнительные лабораторные тесты в прогнозировании нестабильности эндопротеза при первичном эндопротезировании коленного сустава.

Список работ, опубликованных по теме диссертации (16)

1. Матвеева, Е.Л. Биохимические показатели перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в синовиальной жидкости пациентов с эндопротезированием коленного сустава / Е.Л. Матвеева, **Е.С. Спиркина**, И.А. Талашова // Успехи современного естествознания №2015. - №6. – С. 39-42. *Ринц 0,926*.
2. Матвеева, Е.Л. Изменения показателей пероксидации и белкового спектра в синовиальной жидкости больных с патологией суставов / Е.Л. Матвеева, Е.А. Карасев, Т.Ю. Карасева, **Е.С. Спиркина**, И.А. Талашова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований № 2014. - №9 (часть 3). – С. 46-49. *Ринц 0,792*.

3. **Спиркина, Е.С.** Биохимические исследования показателей пероксидации в сыворотке крови собак с моделью дегенеративно-дистрофических изменений в суставах / **Е.С. Спиркина**, Е.Л. Матвеева, М.А. Степанов // Гений ортопедии, Курган 2013. - № 2. – С. 106-108. *ВАК РФ, Ринц 0,168*.
4. **Спиркина, Е.С.** Биохимические изменения в синовиальной жидкости больных с остеоартрозом коленного сустава различной этиологии / Е.Л. Матвеева, **Е.С. Спиркина**, А.Г. Гасанова, П.П. Буравцов, М.Ю. Бирюкова, О.К. Чегуров // Бюл. Восточно-Сибир. науч. центра СО РАМН. – 2013. - №5 (93). – С. 60-63. *ВАК РФ, Ринц 0,126*.
5. Матвеева, Е.Л. Сравнительная характеристика биохимического состава синовиальной жидкости коленных и локтевых суставов человека / Е.Л.Матвеева, **Е.С. Спиркина**, А.Г. Гасанова // Бюл. Восточно-Сибир. науч. центра СО РАМН. - 2013. - № 2-1. - С. 87-89. *ВАК РФ, Ринц 0,126*.
6. **Спиркина, Е.С.** Биохимический состав синовиальной жидкости больных с остеоартрозом коленного сустава / **Е.С. Спиркина**, Е.Л. Матвеева // Вестник Курганского Государственного Университета. Серия: Естественные науки. 2013. - №3 (30). С. 102-105.
7. **Спиркина, Е.С.** Изменение показателей липидного обмена у больных гонартрозом / **Е.С. Спиркина**, Е.Л. Матвеева // Вестник Курганского Государственного Университета. Серия: Физиология, психофизиология, психология и медицина. 2013. - №5 (28). С. 119-121.
8. Матвеева, Е.Л. Перспективы исследования синовиальной жидкости для клинической практики (литературный обзор) / Е.Л. Матвеева, **Е.С. Спиркина**, А.Г. Гасанова // Гений ортопедии, Курган 2012. - №2. - С. 148-151. *ВАК РФ, Ринц 0,168*.
9. Матвеева, Е.Л. Биохимический состав синовиальной жидкости коленного сустава в норме (показатели электролитов и белкового спектра) / Е.Л.Матвеева, **Е.С. Спиркина** А.Г. Гасанова // Клиническая лабораторная диагностика 2012. - №4 - С. 14-16. *Scopus, ВАК РФ. Ринц 0,351*.

10. **Спиркина, Е.Л.** Некоторые показатели биохимического состава синовиальной жидкости / **Е.С. Спиркина**, Е.Л.Матвеева, А.Г. Гасанова // Гений ортопедии, Курган 2012. - № 4. - С. 104-106. *ВАК РФ, Ринц 0,168*.
11. **Спиркина, Е.С.** Биохимический состав синовиальной жидкости у больных перед эндопротезированием коленного сустава / **Е.С. Спиркина**, Е.Л. Матвеева, А.Г. Гасанова // Зауральский научный вестник, Курган 2012. - №2. - С. 85-87.
12. Матвеева, Е.Л. Показатели перекисного окисления белков и липидов синовиальной жидкости больных с травматическими повреждениями коленного сустава / Е.Л. Матвеева, **Е.С. Спиркина**, Т.Ю. Карасева, Е.А. Карасев // Илизаровские чтения: материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Курган, 2012. - С. 189-190.
13. Матвеева, Е.Л. Изменение некоторых показателей перекисного окисления в синовиальной жидкости больных с дегенеративно-дистрофическими поражениями суставов / Е.Л. Матвеева, **Е.С. Спиркина**, П.П. Буравцов, М.Ю. Бирюкова // Илизаровские чтения: материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Курган, 2012. - С. 187-188.
14. Лунева, С.Н. Взаимосвязь показателей белкового спектра и иммуноглобулинов разных классов синовиальной жидкости больных гонартрозом / С.Н. Лунева, Е.Л. Матвеева, М.В. Чепелева, **Е.С. Спиркина**, А.Г. Гасанова // Клиническая Лабораторная диагностика, Москва. – 2010. - №2 - С. 21-23. *Scopus, ВАК РФ, Ринц 0,168*.
15. Матвеева, Е.Л. Исследование биохимического состава синовиальной жидкости локтевого и коленного сустава людей в норме / С.Н. Лунева, Е.Л. Матвеева, **Е.С. Спиркина**, А.Г. Гасанова // Современные проблемы гастроэнтерологии: материалы всероссийской научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения доктора медицинских наук, профессора Я.Д. Витебского. – Курган, 2009. - С.66-67.
16. Матвеева, Е.Л. Сравнительный анализ биохимического состава синовиальной жидкости суставов верхних и нижних конечностей людей в норме /

Е.Л. Матвеева, **Е.С. Спиркина**, А.Г. Гасанова // Актуальные вопросы хирургии верхней конечности: материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Курган, 2009. - С. 87-88.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДДИС – дегенеративно-дистрофические изменения суставов;
- ДК – диеновые конъюгаты;
- ДОА - деформирующий артроз;
- ИГ – идиопатический гонартроз;
- МДА – малоновый диальдегид;
- ОА - остеоартроз;
- ОБ – общий белок;
- ОЛ – общие липиды;
- ОМБ – окислительная модификация белка;
- ПОЛ – перекисное окисление липидов;
- СЖ – синовиальная жидкость;
- ТГ – триглицериды;
- ХЛ – холестерин.